

EPO4/9363

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

REC'D 05 NOV 2004

WIPO PCT

Aktenzeichen: 103 38 735.8
Anmeldetag: 22. August 2003
Anmelder/Inhaber: Fachhochschule Neubrandenburg,
17033 Neubrandenburg/DE
Bezeichnung: Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder
Iso-Emodin aus Aloe vera
IPC: A 61 K, C 12 S

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Oktober 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schmidt C.

Fachhochschule Neubrandenburg

Brodaer Str. 2

17033 Neubrandenburg

Mai 2003
P 62956 We/ap

Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder
Iso-Emodin aus Aloe vera

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin aus Aloe Vera Gel sowie ein Verfahren zur Herstellung von Aloe Vera Gel mit einem Gehalt von weniger als 5 ppm Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin, bei dem eine manuelle Filetierung der Aloe Vera-Blätter und Verluste gegenüber konventionellen Herstellungsverfahren vermieden werden.

In der Pflanzenfamilie der Aloe Vera gibt es die zwei heute kommerziell genutzten Arten *Aloe barbadensis* Miller und *Aloe aborensens*. Diese mehrjährigen Pflanzen aus der Familie der Liliaceae stammen ursprünglich aus Ostafrika; ihr heutiges Anbaugebiet liegt im wesentlichen entlang der Grenze zwischen den USA und Mexico. Der europäische Anbau ist ohne Bedeutung.

Aus den Blättern der Aloe Vera lassen sich zwei Produkte gewinnen. Aus dem Bereich direkt unterhalb der Schale (Cortex) lässt sich ein gelblicher Saft (eine Art Latex) erhalten. Dieser Saft enthält als Hauptinhaltsstoff das Aloin, ein glucosidiertes Anthrachoninderivat (siehe Abb. 1). Dieses Aloin ist ein starkes Abführmittel und wurde über mehr als 2000 Jahre auch als solches genutzt, heute ist es ohne Bedeutung. Aus dem inneren, wasserreichen Gewebe der Pflanzenblätter gewinnt man das Aloe Vera Gel, das auf vielfältige Weise in Kosmetika und anderen Naturprodukten eingesetzt wird. Der diesbezügliche Jahresumsatz wird auf 7 Milliarden € geschätzt. Dieses Aloe Vera Gel darf kein Aloin bzw. die unglykosidierten Anthrachinonderivate Emodin bzw. Iso-Emodin mehr enthalten. Ein Gehalt von weniger als 5 ppm wird angestrebt, jedoch nicht in allen Produkten erreicht. Im Stand der Technik werden Aloe Vera Gele mit Aloin-Gehalten von unter 20 ppm bislang nur durch aufwändige manuelle Filetierung der Aloe Vera Blätter erreicht. Aloe Vera-Produkte mit niedrigen Aloin-Gehalten werden im Stand der Technik nur mit zum Teil erheblichen Verlusten erhalten.

Bei der Verarbeitung zu Aloe Vera Gel geht man bislang wie folgt vor. Nach einer Wäsche werden die Blätter filetiert (Abb. 2), um das Aloin vor der weiteren Verarbeitung abzutrennen. Aufgrund der konkaven Form der Blätter, ihrer stark unterschiedlichen Größe und des Blattaufbaus wird dieses Filetieren überwiegend manuell ausgeführt. Dabei verliert man 20 - 60 % der Erntemasse.

Es hat in der Vergangenheit nicht an Versuchen gefehlt, die Aloe Vera Blätter maschinell zu schälen; die dabei im Produkt

verbleibende Konzentration an Aloin ist jedoch inakzeptabel hoch.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem die Aloin Konzentration in Produkten wie dem Aloe Vera Gel deutlich gesenkt werden und eine manuelle Filetierung vermieden werden kann, ohne zuviel der Erntemasse zu verlieren.

Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß durch die Verwendung von Oxidasen gelöst.

Aus der einschlägigen Fachliteratur sind keine spezifisch auf das Aloin abbauend wirksamen Enzyme oder Enzymsysteme bekannt; im Magen-/Darmtrakt wird das Aloin allerdings durch Glucosidasen deglucosidiert und das dabei entstehende Iso-Emodin besitzt die eigentliche laxative Wirkung.

Qualitativ lassen sich Aloin, Emodin und ihre Isomeren besonders gut durch die Dünnschichtchromatographie nachweisen.

Zur quantitativen Analytik eignet sich, aufgrund der starken Absorption der in Rede stehenden Verbindungen im Bereich des sichtbaren Lichtes, insbesondere die Photometrie. Beide Methoden erlauben jedoch für sich keine Rückschlüsse auf die Natur eventuell entstehender Abbauprodukte. Zu deren Analyse wurde die gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS) verwendet. Allerdings ist nur das (unglucosidierte) Emodin unzersetzt verdampfbar und damit per GC analysierbar.

Überraschenderweise gelang es nun erstmals, das Aloin mit Hilfe oxidativ wirkender Enzyme (Oxidasen), insbesondere aus den Klassen der Peroxidasen (E.C. 1.11.1.7) und Laccasen (E.C.

1.10.3.2.), abzubauen. Peroxidasen wirken bekanntermaßen auf Substrate wie z.B. das Guaiacol; Laccasen auf die Bestandteile des Lignins; es ist durchaus als überraschend anzusehen, dass diese Enzyme Aloin bzw. Emodin als Substrate akzeptieren. Als Oxidationsmittel wurde dabei im Labor vorzugsweise das auch in kleinen Mengen exakt dosierbare Wasserstoffperoxid eingesetzt, bei größeren Ansätzen kann die Oxidation jedoch auch mit Hilfe von Luftsauerstoff erfolgen.

Der Nachweis des Abbaus des Aloins erfolgt zuerst durch Dünnschichtchromatographie im direkten Vergleich mit einer unbehandelten Probe. Darüber hinaus war ein drastischer Rückgang der typischen Extinktion im Photometer bei 328 nm zu beobachten. Völlig analog ist der Abbau des Emodins zu beobachten. Darüber hinaus zeigt ein Gaschromatogramm des Emodins nach oxidativem Abbau vier neue Signale bei deutlich verringelter Retentionszeit. Bei den Signalen handelt es sich nach Auswertung der Massenspektren um Derivate der Salicylsäure.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin aus Aloe Vera Gel, bei dem man das Gel mit einer Oxidase unter für die enzymatische Aktivität geeigneten Bedingungen in Kontakt bringt.

Damit wird ferner ein Verfahren zu Herstellung von Aloe Vera Gel mit einem Gehalt von weniger als 5 ppm Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin ohne manuelle Filetierung bereitgestellt, bei dem man das Gel mit einer Oxidase unter für die enzymatische Aktivität geeigneten Bedingungen in Kontakt bringt. Die Oxidase wird gegebenenfalls, z.B. zur Wiederverwendung des Enzyms, nach erfolgter Reaktion vom Gel abgetrennt.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Oxidase eine Peroxidase, vorzugsweise Peroxidase E.C.1.11.1.7 aus *Glycine max.*, oder Laccase, vorzugsweise Oxidase E.C.1.10.3.2 aus *Rhus vernicifera*.

Die Oxidase kann in isolierter oder gereinigter Form vorliegen oder in Form eines Naturstoffextrakts. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet man als Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid oder (Luft-) Sauerstoff.

Die enzymatische Reaktion wird vorteilhafterweise in einer wässrigen Suspension oder Lösung des Aloe Vera Gels durchgeführt. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist die Suspension oder Lösung auf den pH-Wert, der das Wirkungsmaximum des Enzyms darstellt, gepuffert.

Das Aloe Vera Gel ist vorzugsweise durch ein vorgenanntes bzw. im Beispielteil beschriebenes Verfahren erhältlich. Für den Fachmann dürfte es sich aber verstehen, dass Modifikationen der erfindungsgemäßen Verfahren möglich sind (wie z.B. Variationen der Reaktionsbedingungen, Lösungsmittel, Enzyme etc.), die im wesentlichen zu demselben oder einem verbesserten Ergebnis, nämlich dem Abbau von Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin in Aloe vera Gel, führen.

Die vorliegende Erfindung weist insbesondere den Vorteil auf, dass aufwändiges manuelles Zerteilen der Aloe vera Blätter nicht erforderlich ist und somit Rohmaterialverluste vermieden werden und ein sehr reines Produkt erhalten wird.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert; sie stellen jedoch keine Einschränkung der beschriebenen Erfindung dar.

BeispieleBeispiel 1

Zu 3 ml einer ethanolischen Lösung von 1000 ppm Aloin in einer 1-cm PMMA-Küvette werden 0,5 mg Peroxidase (E.C. 1.11.1.7; *Glycine max.*) und 8 µl einer 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Innerhalb von 2 Stunden sinkt die Extinktion im Photometer bei 328 nm von 1,589 auf 0,538. Nach 12 h kann im Dünnschichtchromatogramm kein Aloin-Signal mehr gefunden werden.

Beispiel 2

Zu 3 ml einer Lösung von 200 ppm Emodin in Tetrahydrofuran in einer 1-cm Quarzglas-Küvette werden 0,5 mg Peroxidase und 8 µl einer 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung gegeben. Innerhalb von 2 Stunden sinkt die Extinktion im Photometer bei 328 nm von 2,646 auf 0,709. Nach 12 h kann im Dünnschichtchromatogramm kein Emodin-Signal mehr gefunden werden. Im Gaschromatogramm erkennt man eine ein neues Signal bei 13,6 min (Emodin 19,4 min) Das Massenspektrum zeigt Dimersignale der Abbauprodukte bei 148 + 133 u.

Beispiel 3

Beispiel 1 wird mit einer wässrigen Suspension von 1000 ppm Aloin wiederholt. Auch hier verringert sich die Extinktion im Photometer bei 328 nm, und nach 12 Stunden kann im Dünnschichtchromatogramm kein Aloin-Signal mehr gefunden werden.

Beispiel 4

Zu 4 ml einer 2,5 %-igen Lösung von Emodin in Ethanol/Wasser (20/80 v/v) werden 2 mg Peroxidase gegeben und anschließend zwei Stunden ein leichter Pressluftstrom über eine Pasteurpipette eingeleitet. Dabei verfärbt sich die Lösung von kräftig gelb zu tiefrot. Durch Säulenchromatographie kann eine Fraktion mit den in Beispiel 2 beschriebenen Eigenschaften abgetrennt werden.

Beispiel 5

Beispiel 1 wird mit 0,5 mg einer Laccase (E.C. 1.10.3.2.; *Rhus vernicifera*) wiederholt, deren Aktivität vorher mit Syringaldazin sichergestellt wurde. Es wird eine Suspension von 1000 ppm Aloin in Phosphatpuffer (pH-Wert 6,5) unter Zusatz von 5 Vol.-% Ethanol verwendet. Auch hier verringert sich die Extinktion im Photometer bei 328 nm, und nach 12 Stunden kann im Dünnschichtchromatogramm kein Aloin-Signal mehr gefunden werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin aus Aloe Vera Gel, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gel mit einer Oxidase unter für die enzymatische Aktivität geeigneten Bedingungen in Kontakt bringt.
2. Verfahren zu Herstellung von Aloe Vera Gel mit einem Gehalt von weniger als 5 ppm Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gel mit einer Oxidase unter für die enzymatische Aktivität geeigneten Bedingungen in Kontakt bringt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Oxidase nach erfolgter Reaktion vom Gel abtrennt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidase eine Peroxidase oder Laccase ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peroxidase Peroxidase E.C.1.11.1.7 aus *Glycine max.* ist.
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidase Oxidase E.C.1.10.3.2 aus *Rhus vernicifera* ist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oxidase in Form eines Naturstoffextrakts vorliegt.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid oder (Luft-)Sauerstoff verwendet.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man die enzymatische Reaktion in einer wässrigen Suspension oder Lösung des Aloe Vera Gels.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Suspension oder Lösung gepuffert ist.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Entfernung von Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin aus Aloe Vera Gelsowie ein Verfahren zur Herstellung von Aloe Vera Gel mit einem Gehalt von weniger als 5 ppm Aloin, Emodin und/oder Iso-Emodin, bei dem eine manuelle Filetierung der Aloe Vera-Blätter und Verluste gegenüber konventionellen Herstellungsverfahren vermieden werden.